

(11)特許出願公開番号

(43)公開日 平成8年(1996)8月6日

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 シュードモナス・セバシア (*Pseudomonas cepacia*) H-4(FERM P-14534)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) K4-3 (FERMP-14535)、クレブシエラ・ニューモニアエ (*Klebsiella pneumoniae*) E-1 (FERMP-14536)、クレブシエラ・ニューモニアエ (*Klebsiella pneumoniae*) K4-1(FERM P-14537)、クレブシエラ・プランチコーラ (*Klebsiella planticola*) O-1(FERM P-14538) 及びセラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) K3-2(FERM P-14539) から選択された陰イオン界面活性剤分解性微生物を固定化した担体と、酸素電極とが組み合わされていることを特徴とする、微生物を用いた陰イオン界面活性剤センサー。

【請求項 2】 微生物がアルギン酸カルシウムゲルに固定され、管内に充填されていることを特徴とする、請求項 1 に記載の陰イオン界面活性剤センサー。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 に記載の陰イオン界面活性剤センサーと、該センサーを一定の温度に保つ恒温槽と、センサーにおける酸素電極の電流を測定する電圧電流計及び測定された電流の変化を記録する機構を有するレコーダとを備えていることを特徴とする、陰イオン界面活性剤測定システム。

【請求項 4】 請求項 1 又は 2 に記載の陰イオン界面活性剤センサーにおける微生物担体に一定温度の緩衝液を導くと共に酸素電極を流れる電流を測定し、電流値が安定した時点で上記のセンサーに一定温度の試料液を導いて酸素電極を流れる電流を測定し、電流の減少の割合から試料液中の陰イオン界面活性剤濃度を測定することを特徴とする、陰イオン界面活性剤の測定法。

【請求項 5】 雑食性酵母であるトリコスポロン・クタネウム(*Trichosporon cutaneum*) (IFO 10466) をアルギン酸カルシウムゲルに固定し管内に充填したカラムを備え、このカラムにも試料液を送液し電流変化を調べて陰イオン界面活性剤分解性微生物に関して得られた電流減少値を補正することを特徴とする、請求項 4 に記載の陰イオン界面活性剤の測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は微生物を用いた陰イオン界面活性剤センサー、該センサーを用いる陰イオン界面活性剤の測定法及び測定システムに係る。本発明は、殊に合成洗剤による河川水等の汚染状況を調べる目的で用いられる。

【0002】

【従来の技術】 合成洗剤は現在の生活にとって必要不可欠な物質であるが、その使用の結果、下水道の整備に伴い最終的には河川に流入し、環境汚染をもたらす危険性が強く指摘されている。合成洗剤用界面活性剤としては陰イオン界面活性剤である炭素数 12 の直鎖性アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (以下、「C₁₂LAS」と称

する) が最も汎用されており、従って合成洗剤による河川水等の汚染状況を調べるためには、当該物質を特異的に計測することが必要である。

【0003】 上記の C₁₂LAS を含めて陰イオン界面活性剤の微量定量に関する従来法としては、溶媒抽出-比色定量を利用する方法と、分析機器を用いる方法に大別される。前者にはメチレンブルー吸光度法とエチルバイオレット吸光度法があり、又後者には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法、ガスクロマトグラフィー法、赤外線吸収スペクトル法等を挙げることができる。これらの定量法において、一般に単純な濃度の計測には、クロロホルム中にメチレンブルーと陰イオン界面活性剤との錯体を抽出し、比色定量する方法であるメチレンブルー吸光度法が使用され、試料中の濃度の計測だけではなく生分解の程度も併せて観察する必要がある場合には高速液体クロマトグラフィー法に代表される機器分析法が採用されている。尚、日本工業規格 (JIS) にはメチレンブルー吸光度法、エチルバイオレット吸光度法及び溶媒抽出-フレイム原子吸光度法が規定されている (K0101)。

【0004】

【発明が解決しようとする課題乃至発明の目的】 上記の従来技術による陰イオン界面活性剤の定量法において、メチレンブルー吸光度法に代表される溶媒抽出-比色定量法は操作が極めて煩雑であり、所要時間が長い点に課題がある。尚、汎用されているメチレンブルー吸光度法は陰イオン界面活性剤以外のメチレンブルーに活性な妨害物質をも定量してしまう可能性があり、微量分析法としては正確性に欠ける点にも課題がある。一方、機器分析法は、溶媒抽出-比色定量法と比較した場合に簡便な方法と云うことができるが、前処理が煩雑であり、機器が高価であるために経済的に有利な方法とは云えない。更に、河川水等を対象とし、合成洗剤による汚染状況を調べるための陰イオン界面活性剤の定量法としては、フィールドにおいて、即ち河川水等の試料水採取の場において実施し得ることが好ましいが、何れの従来法も十分に迅速・簡便なものとは云えず、又測定機器の運搬が容易ではない点並びに有機溶媒を大量に必要とするので環境科学的には有機溶媒の廃液処理が要求される点に極めて重大な課題が残る。

【0005】 従って、本発明の基本的な目的は環境科学的に考慮され、迅速且つ簡便な陰イオン界面活性剤の定量法を確立することにある。本発明の具体的な第 1 目的は、試料液の前処理を必要とせず、測定に有機溶媒を用いず且つ測定所要時間が短い、新たな陰イオン界面活性剤センサーを提供することにある。本発明の具体的な第 2 及び第 3 目的は、新たに開発された上記の陰イオン界面活性剤センサーを用いる陰イオン界面活性剤の測定システム及び測定法を提供すると共に、所要機器を簡素化してフィールドでのモニタリングすら可能ならしめることにある。

【0006】

【課題を解決し目的を達成する手段及び作用】本発明によれば、上記の第 1 目的は、シュードモナス・セバシア (*Pseudomonas cepacia*) H-4 (FERM P-14534)、シュードモナス・ブチダ (*Pseudomonas putida*) K4-3 (FERM P-14535)、クレブシエラ・ニューモニアエ (*Klebsiella pneumoniae*) E-1 (FERM P-14536)、クレブシエラ・ニューモニアエ (*Klebsiella pneumoniae*) K4-1 (FERM P-14537)、クレブシエラ・ブランチコーラ (*Klebsiella planticola*) O-1 (FERM P-14538) 及びセラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) K3-2 (FERM P-14539) から選択された陰イオン界面活性剤分解性微生物を固定化した担体と、酸素電極とが組み合わされていることを特徴とする、微生物を用いた陰イオン界面活性剤センサーにより達成される。

【0007】上記の陰イオン界面活性剤センサー（以下、単に「センサー」と称する場合がある）において、微生物をアルギン酸カルシウムゲルに固定し、管内に充填しておけば、微生物とその担体とをバイオリアクターとしてユニット化することができるので有利である。

【0008】上記の第 2 目的は、上記のセンサーと、該センサーを一定の温度に保つ恒温槽と、センサーにおける酸素電極の電流を測定する電圧電流計及び測定された電流の変化を記録する機構を有するレコーダとを備えていることを特徴とする、陰イオン界面活性剤測定システムにより達成される。

【0009】上記の第 3 目的は、上記のセンサーにおける微生物担体に一定温度の緩衝液を導くと共に酸素電極を流れる電流を測定し、電流値が安定した時点で上記のセンサーに一定温度の試料液を導いて酸素電極を流れる電流を測定し、電流の減少の割合から試料液中の陰イオン界面活性剤濃度を測定することとを特徴とする、陰イオン界面活性剤の測定法により達成される。

【0010】尚、人工的に調製された陰イオン界面活性剤溶液を試料液とする場合には、陰イオン界面活性剤分解性微生物にとって至適乃至ほぼ至適な条件に試料液を設定することが可能であるが、河川水等の実試料を試料液とする場合には、妨害物質の影響がバックグラウンドとして現れ、電流減少値が若干高めとなる傾向がある。

【0011】本発明によれば、上記の妨害物質による影響は、雑食性酵母であるトリコスポロン・クタネウム (*Trichosporon cutaneum*) (IFO 10466) をアルギン酸カルシウムゲルに固定し管内に充填したカラムを備え、このカラムにも試料液を送液し電流変化を調べて陰イオン界面活性剤分解能を有する微生物に関して得られた電流減少値を補正することにより排除することができる。

【0012】本発明によれば、上述のように、陰イオン界面活性剤、殊に C_{12} LAS を特異的に生分解する微生物を固定化して用いており〔これらの微生物は活性汚泥や各地の河川水から単離された好気性細菌であり、既述の

ように「FERM P-14534」-「FERM P-14539」なる受託番号を以て工業技術院生命工学工業技術研究所（微工研）に寄託された〕、この固定化微生物には緩衝液、例えばトリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) 及び試料液が送られるだけであり、試料液に前処理が要求されず且つ有機溶媒が使用されず、本発明が採用する測定原理は試料液中に C_{12} LAS が存在すると、上記の微生物が当該物質を生分解し、呼吸活性が上昇し、その結果試料液中の酸素濃度が減少し、この溶存酸素量を酸素電極により測定し、試料液が導入される前の酸素濃度と溶存酸素量の変化を酸素電極を流れる電流の減少として捉えて試料液中の C_{12} LAS 濃度を測定するものである。従って、測定に使用される機器類もバイオリアクターと、恒温槽と、酸素電極と、電圧電流計及び電流値の変化を記録する機構を備えたレコーダと、送液用のポンプと、配管のみであるのでコンパクトなものとなすことができ、測定所要時間も 10-30 分程度（主として試料液の pH に依存）であり、更に測定値の補正が可能であるために、従来技術における既述の課題が解決され、本発明の目的が達成されるのである。

【0013】

【実施例等】次に、陰イオン界面活性剤分解能を有する微生物の取得例、実施例及び試験例に関連して本発明を更に詳細に且つ具体的に説明する。

微生物の取得例

活性汚泥及び各地の河川水から、0.01 重量% の C_{12} LAS と 0.10 重量% 酵母エキスのみを含有する制限培地中で生育する菌株を単離・馴化した。得られた菌株であって C_{12} LAS 分解能がほぼ同様であって優れている菌株は、下記の 6 種類であり、微工研に寄託された。

- (a) シュードモナス・セバシア H-4 (FERM P-14534)、
- (b) シュードモナス・ブチダ K4-3 (FERM P-14535)、
- (c) クレブシエラ・ニューモニアエ E-1 (FERM P-14536)、
- (d) クレブシエラ・ニューモニアエ K4-1 (FERM P-14537)、
- (e) クレブシエラ・ブランチコーラ O-1 (FERM P-14538) 及び
- (f) セラチア・マルセッセンス K3-2 (FERM P-14539)。

【0014】実施例

図 1 に示される通りの C_{12} LAS 測定システムを構築した。この測定システム 10 において、12 は試料液 121 を収容している磁気式スターラ付きボトルであり、14 はボトル 12 と同様の、但し緩衝液 141 を収容するボトルであり、16 は緩衝液 141 及び試料液 121 用の送液ポンプ（ペリスタ・ポンプ, peristaltic pump）であり、18 はサーモスタット 181 を備えた恒温槽であり、20 は微生物固定化リアクターであり、22 はフローセル (flow cell) タイプの酸素電極であり、24 は酸素電極 22 における電流を連続的に測定する電圧電流計及び電流の減少変化をチャートとして描記する機構を備えたレコーダであり、26 は配管 28、30 及び 32 を経て遊端

から排出される液を受ける廃液用ボトルである。微生物固定化リアクタ 20 はガラス製細管 201 と、既述の C_{12} LAS 分解性微生物をアルギン酸カルシウムゲルに担持させ、上記の細管 201 内に充填した固定化微生物 203 と、緩衝液 141 及び試料液 121 の送液に際して固定化微生物が流出しないように且つ試料液中に場合により存在する浮遊物が微生物固定化担体に達してその機能を損なわないようにするために細管 201 の両端に配置された透水性充填物 (図示せず) を備えており、この微生物固定リアクタ 20 はゴム管 205a、205b にて配管 30、32 と接続されている。

【0015】試験例 1

上記の「微生物の取得例」に示されている微生物の中で、どの微生物を用いても、微生物の至適条件、 C_{12} LAS 濃度の測定結果等は同様であったが、河川水起源のクレブシエラ・ニューモニアエ E-1 (FERM P-14536) を選択し、図 1 に示される測定システムを用いて C_{12} LAS 濃度を測定した場合を下記に示す。上記の微生物の至適条件は pH 7.0、35°C であるが、微生物の寿命乃至センサーとしての安定性を配慮して pH を 7.0 に且つ温度を 30°C に設定した。即ち、既知である各種濃度となるように C_{12} LAS を添加して試料水溶液 (C_{12} LAS 濃度 : 0、1、2、及び 4mg/l) を調製し且つ恒温槽における水温を 30°C に設定した (緩衝液は使用せず)。尚、湿潤重量で 2.5g の微生物をアルギン酸カルシウムゲルに固定化し、カラム (ガラス製細管、容量 : 30ml) に入れ、両端に透水性充填物を詰めることによりバイオリアクタを構成した。ペリスタ・ポンプによる送液流量を 0.5ml/min. に設定し、又レコーダの設定条件を抵抗 5K Ω 、電圧 ± 10 mV、チャートスピード 180mm/hr. とし、上記の各試料水溶液を送液して電流値の減少度合を調べた。この場合の応答曲線は図 2 に示される通りであり、 C_{12} LAS の濃度に依存して応答性が高くなることが判る。尚、測定所要時間は約 10 分間と短いことも判る。

【0016】試験例 2

上記の試験例 1 と同様にして試料水溶液中の C_{12} LAS 濃度と電流値の減少度合との関係を調べた。結果は図 3 に示されている通りであり、直線性は C_{12} LAS 濃度 0 - 7mg/l であり、検出限界は 0.1mg/l であった。尚、本試験例の場合は至適 pH ではないために、測定所要時間として 30 分間を要した。

【0017】試験例 3

既述の試験例 1 と同様の条件で、但し緩衝液としてトリス塩酸緩衝液 (pH7.0) を用い、又該緩衝液に既知である各種濃度となるように C_{12} LAS を添加して試料液 (C_{12} LAS 濃度 : 0、1、2、3、及び 4mg/l) を調製した。この場合における試料液中の C_{12} LAS 濃度と電流の減少値との関係は図 4 に示される通りであり、 C_{12} LAS 濃度が 数mg/l 迄はほぼ直線的な応答性を示すことが確認された。尚、この場合の測定所要時間は約 10 分間で

あった。

【0018】各地の河川から河川水を採取して試料液とした場合と、試験例 3 におけるように緩衝液に C_{12} LAS を添加して所定濃度の試料液とした場合とを比較した。河川水の場合には電流の減少値に増加が認められることが判明した。この傾向は、何処の河川水の場合にも同様であった。これは、河川水等の実試料中に存在する妨害物質の影響がバックグラウンドとして現れているものと考えられる。そこで、 C_{12} LAS に対する分解能を有さないが、雑食性を有している酵母であるトリコスボロン・クタネウム (*Trichosporoncutaneum*) IFO 10446 を C_{12} LAS に代えてアルギン酸カルシウムゲルに固定化して試験例 1 と同様測定を行い、図 4 における直線の y 切片を決定した (図 4 中の A 部分)。従って、図 4 に示されるグラフは検量線として使用することができる。

【0019】試験例 4 (従来法との相関)

河川水を対象として、本発明による測定法及び従来法である高速液体クロマトグラフィー法により C_{12} LAS 濃度を測定し、両者の相関関係を調べた結果は図 5 に示されており、この場合に回帰式 $y = 0.08 + 0.76x$ であって、相関係数は 98% であり、両方法は高い相関を有していることが判明した。

【0020】

【発明の効果】本発明によれば、微生物を用いるバイオセンサーを検出部とすることにより、殊に合成洗剤による河川等の汚染の目安となる陰イオン界面活性剤、殊に炭素数 12 の直鎖性アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムの濃度を簡便に且つ短時間で測定することができ、従来法と異なり有機溶媒を使用しないので環境汚染を引き起こすこともない。本発明による測定システムは単純であり、コンパクトに構成することができるので、試料液採取の採取の場においても測定が可能であり、従ってリアルタイムのモニタリングを実現できる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明による陰イオン界面活性剤測定システムの概略図である。

【図 2】陰イオン界面活性剤として炭素数 12 の直鎖性アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムを採択し、各種濃度の陰イオン界面活性剤水溶液を調製し、これを試料液として用いた場合に、図 1 に示される測定システムにおけるレコーダのチャートに自動描記された電流値の減少を示す図面である。

【図 3】試料液の pH が至適値ではない場合の電流の減少値と試料液中の陰イオン界面活性剤濃度との関係を示すグラフである。

【図 4】図 3 と同様の、但し各種濃度の陰イオン界面活性剤緩衝液溶液を調製し、測定された電流の減少値と試料液中の陰イオン界面活性剤濃度との関係を示すグラフであり、このグラフでは河川水が試料水として適用さ

7
れるように y 切片が既に補正されているので、検量線ともなるグラフである。

【図5】本発明による測定法と、従来法であって精度において信頼し得る高速液体クロマトグラフィー法との相関を示すグラフである。

【符号の説明】

10 : 陰イオン界面活性剤測定システム、

12 : 試料液ボトル、

121 : 試料液、

* 14 : 緩衝液ボトル、

141 : 緩衝液、

16 : 送液用ポンプ、

18 : 恒温槽、

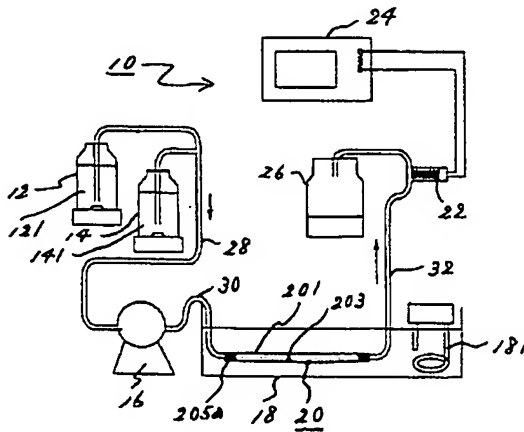
20 : 微生物固定化 (バイオ) リアクタ、

22 : 酸素電極、

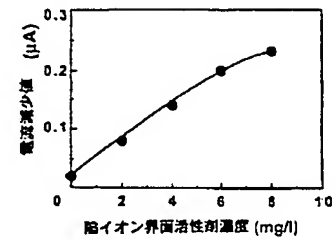
24 : 電圧電流計及びチャート描記用機構を備えたレコーダ、

* 26 : 廃液用ボトル

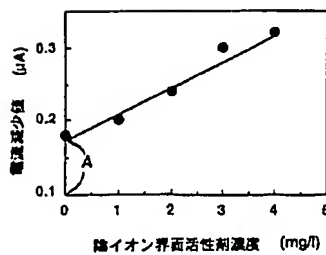
【図1】



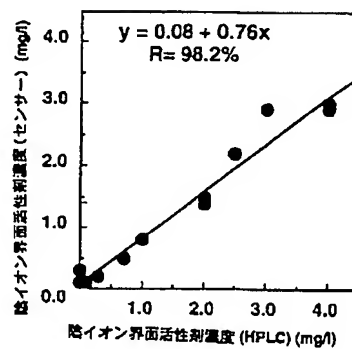
【図3】



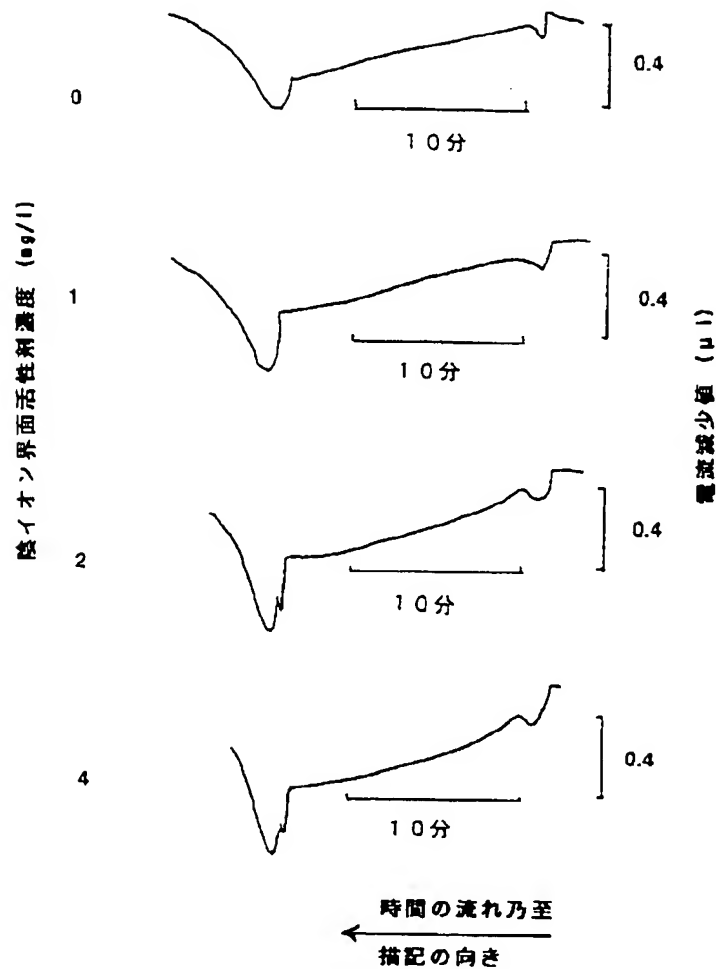
【図4】



【図5】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁸
G 0 1 N 31/00

識別記号

庁内整理番号

T

F I

技術表示箇所

(72)発明者 ▲あべ▼松 義弘
千葉県松戸市初富飛地7-1 建設省関東
技術事務所内

(72)発明者 望月 誠一
東京都千代田区大手町1丁目3番1号 建
設省関東地方建設局内

(72)発明者 軽部 征夫
神奈川県川崎市宮前区東有馬1-3-16

(72)発明者 山崎 久勝
東京都港区虎ノ門1丁目11番7号 社団法
人 建設電気技術協会内

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-196295

(43)Date of publication of 06.08.1996
application :

(51)Int.Cl. C12Q 1/00

G01N 27/327

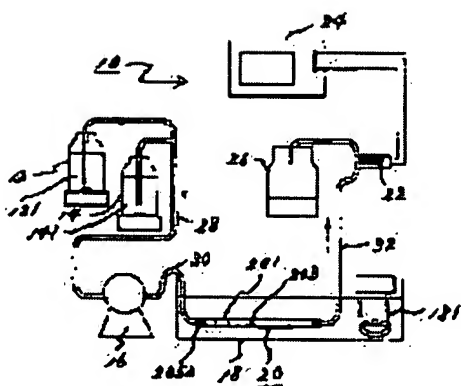
G01N 27/416

G01N 31/00

(21)Application 07-001781 (71)Applic KENSETSU KANTO
number : ant : CHIHO KENSETSU
KYOKUCHO
KARUBE MASAO
KENSETSU DENKI GIJUTSU
KYOKAI

(22)Date of 10.01.199 (72)Invent ABEMATSU YOSHIHIRO
filing : 5 or : MOCHIZUKI SEIICHI
KARUBE MASAO
YAMAZAKI HISAKATSU

(54) ANIONIC SURFACTANT SENSOR USING MICROORGANISM



(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject sensor having simple and easy operability and useful e.g. for the examination of the pollution of river water with synthetic detergents by combining an oxygen electrode with a carrier holding an immobilized microorganism capable of decomposing anionic surfactant such as *Pseudomonas cepacia* H-4.

CONSTITUTION: An anionic surfactant sensor is produced by combining an oxygen electrode 22 with a carrier 20 holding an

immobilized microorganism capable of decomposing anionic surfactants such as *Pseudomonas cepacia* H-4 (FERM P-14534), *Pseudomonas putida* K4-3 (FERM P-14535), *Klebsiella pneumoniae* E-1 (FERM P-14536), *Klebsiella pneumoniae* K4-1 (FERM P-14537), *Klebsiella planticola* O-1 (FERM P-14538) or *Serratia marcescens* 3-2 (FERM P-14539). The objective system 10 for the determination of anionic surfactant is produced by holding the sensor in a thermostatic bath 18 and combining the sensor with a voltammeter to determine the electric current of the oxygen electrode 22 of the sensor and a recorder 24 for recording the measured data.

LEGAL STATUS

[Date of request for
examination]

[Date of sending the examiner's
decision of rejection]

[Kind of final disposal of
application other than the
examiner's decision of

rejection or application
converted registration]
[Date of final disposal for
application]
[Patent number]
[Date of registration]
[Number of appeal against
examiner's decision of
rejection]
[Date of requesting appeal
against examiner's decision of
rejection]
[Date of extinction of right]

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] Pseudomonas SEPASHIA (Pseudomonas cepacia) H-4 (FERM P-14534), Pseudomonas putida (Pseudomonas putida) K4-3 (FERMP-14535), Klebsiella new MONIAE (Klebsiella pneumoniae) E-1 (FERMP-14536), Klebsiella new MONIAE (Klebsiella pneumoniae) K4-1 (FERM P-14537), Klebsiella plan CHIKORA () [Klebsiella] planticolaO-1 (FERM P-14538) And Serratia marcescens (Serratia marcescens) K3-2 (FERM P-14539) from -- with the support which fixed the selected anionic surfactant resolvability microorganism The anionic surfactant sensor using a microorganism characterized by putting the oxygen electrode together.

[Claim 2] Claim which a microorganism is fixed to calcium-alginate gel and characterized by filling up in tubing 1 Anionic surfactant sensor of a publication.

[Claim 3] claim 1 or -- 2 Anionic surfactant gaging system characterized by having the recorder which has the device which records change of the thermostat which maintains the anionic

surfactant sensor and this sensor of a publication at fixed temperature, the voltameter which measures the current of the oxygen electrode in a sensor, and the measured current.

[Claim 4] claim 1 or -- 2 Measuring method of an anionic surfactant characterized by measuring the current which leads the sample solution of constant temperature to the above-mentioned sensor, and flows an oxygen electrode when the current which flows an oxygen electrode is measured and a current value is stabilized, while leading the buffer solution of constant temperature to the microorganism support in the anionic surfactant sensor of a publication, and measuring the anionic surfactant concentration in a sample solution from the degree of reduction in a current.

[Claim 5] Trichosporon KUTANEUMU (Trichosporon cutaneum) which is omnivorous yeast (IFO 10466) Claim characterized by amending the current deduction which was equipped with the column with which fixed to calcium-alginate gel and it was filled up in tubing, sent the sample solution also in this column, investigated current change, and was acquired about the anionic surfactant resolvability microorganism 4 Measuring method of the anionic surfactant of a publication.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the measuring method and gaging system of an anionic surfactant using the anionic surfactant sensor and this sensor which used the microorganism. This invention is used in order to investigate contamination situations, such as river water by synthetic detergent, especially.

[0002]

[Description of the Prior Art] Although synthetic detergent is the indispensable matter for a current life, as a result of the

use, finally it flows into a river with maintenance of sewerage, and the danger of bringing about environmental pollution is pointed out strongly. It is the carbon number which is an anionic surfactant as a surface active agent for synthetic detergent. 12 Straight chain nature alkyl benzene sodium sulfonate ("C12LAS" is called hereafter) In order to be most used widely, therefore to investigate contamination situations, such as river water by synthetic detergent, it is required to measure the matter concerned specifically.

[0003]. Above C12LAS It is divided roughly into the approach of including and using solvent extraction-colorimetry as a conventional method about the microestimation of an anionic surfactant, and the approach using instrument for analysis. There are a methylene-blue extinction method and an ethyl violet extinction method in the former, and it is high performance chromatography in the latter. (HPLC) Law, the gas-chromatography method, an infrared absorption spectral method, etc. can be mentioned. In such assays, generally, when the methylene-blue extinction method which is the approach of extracting the complex of a methylene blue and an anionic surfactant and carrying out colorimetry needs to be used and it is necessary to combine not only measurement of the concentration in a sample but extent of biodegradation in chloroform, and to observe, the instrumental-analysis method represented by the high-performance-chromatography method is adopted as measurement of simple concentration. in addition, Japanese Industrial Standards (JIS) **** -- the method is specified whenever [methylene-blue extinction method ethyl violet extinction method, and solvent extraction-frame atomic absorption] (K0101) .

[0004]

[Object of the Invention thru/or the purpose of invention] In the assay of the anionic surfactant by the above-mentioned conventional technique, the solvent extraction-colorimetry method represented by the methylene-blue extinction method has very complicated actuation, and a technical problem is in the

point that a duration is long. In addition, the methylene-blue extinction method currently used widely may carry out the quantum also of the activity interfering substance to methylene blues other than an anionic surfactant, and there is a technical problem also in the point that accuracy is missing as microanalysis. On the other hand, although it can be called a simple approach in comparison with a solvent extraction-colorimetry method, an instrumental-analysis method has complicated pretreatment, and since the device is expensive, it cannot be economically called advantageous approach. furthermore, as assay of the anionic surfactant for investigating the contamination situation by synthetic detergent for river water etc. Although it is [in / the field] desirable that it can carry out at the place of sample water extraction of river water etc. Since neither of the conventional methods can be called thing quick enough and simple and conveyance of measuring equipment needs an organic solvent for the point list which is not easy in large quantities, the very serious technical problem for the point that waste fluid processing of an organic solvent is required in environmental science remains.

[0005] Therefore, the fundamental purpose of this invention is taken into consideration in environmental science, and it is in establishing the assay of a quick and simple anionic surfactant. Concrete ** of this invention 1 The purpose does not need pretreatment of a sample solution but is not to use an organic solvent for measurement and offer a new anionic surfactant sensor with a short measurement duration. Concrete ** of this invention 2 And ** 3 If a necessary device is simplified and even the monitoring in the field is possible while the purpose offers the gaging system and measuring method of an anionic surfactant using the newly developed above-mentioned anionic surfactant sensor, it is in closing.

[0006]

[The means and operation] which solve a technical problem and attain the purpose According to this invention, it is above **.

1 The purpose Pseudomonas SEPASHIA (*Pseudomonas cepacia*) H-4 (FERM P-14534), *Pseudomonas putida* (*Pseudomonas putida*) -- K4-3 (FERM P-14535) -- *Klebsiella* new MONIAE (*Klebsiella pneumoniae*) E-1 (FERM P-14536), *klebsiella* new MONIAE (*Klebsiella pneumoniae*) -- K4-1 (FERM P-14537) -- *Klebsiella* plan CHIKORA () [*Klebsiella*] *planticola* O-1 (FERM P-14538) And *Serratia marcescens* (*Serratiamarcescens*) K3-2 (FERM P-14539) from -- with the support which fixed the selected anionic surfactant resolvability microorganism It is attained by the anionic surfactant sensor using a microorganism characterized by putting the oxygen electrode together.

[0007] The above-mentioned anionic surfactant sensor (a "sensor" may only be called hereafter) If it sets, a microorganism is fixed to calcium-alginate gel and it is filled up in tubing, since they can carry out unitization, being able to use a microorganism and its support as a bioreactor, it is advantageous.

[0008] Above ** 2 The purpose is attained by the anionic surfactant gaging system characterized by having the recorder which has the device which records change of the thermostat which maintains an above-mentioned sensor and this above-mentioned sensor at fixed temperature, the voltmeter which measures the current of the oxygen electrode in a sensor, and the measured current.

[0009] Above ** 3 The purpose is attained by the measuring method of an anionic surfactant characterized by measuring the current which leads the sample solution of constant temperature to the above-mentioned sensor, and flows an oxygen electrode when the current which flows an oxygen electrode is measured and a current value is stabilized, while leading the buffer solution of constant temperature to the microorganism support in the above-mentioned sensor, and measuring the anionic surfactant concentration in a sample solution from the degree of reduction in a current.

[0010] In addition, when making into a sample solution the anionic surfactant solution prepared artificially, it is

possible for an anionic surfactant resolvability microorganism to set a sample solution as optimum thru/or almost optimum conditions, but in making real samples, such as river water, into a sample solution, the effect of the interfering substance appears as the background, and there is an inclination for current deduction to become high a little.

[0011] Trichosporon KUTANEUMU whose effect by the above-mentioned interfering substance is omnivorous yeast according to this invention (Trichosporon cutaneum) (IFO 10466) the column with which fixed to calcium-alginate gel and it was filled up in tubing -- having -- this column -- a sample solution -- sending the liquid -- current change -- investigating -- an anionic surfactant -- it can eliminate by amending the current deduction acquired about the microorganism which has resolution.

[0012] according to this invention -- above -- an anionic surfactant -- especially -- C12LAS the microorganism which biodegrades specifically -- fixing -- using -- **** -- These microorganisms are the aerobic bacteria isolated from active sludge or the river water of every place. [-- previous statement -- like -- "FERM P-14534"- "FERM P-14539" -- a trust number -- with -- **** -- National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (Fermentation Research Institute) deposited] -- In this immobilized microorganism, it is the buffer solution (pH 7.0), for example, the tris hydrochloric-acid buffer solution. And a sample solution is only sent. The measurement principle which pretreatment is not required of a sample solution, an organic solvent is not used, but this invention adopts is in a sample solution. C12LAS If it exists The above-mentioned microorganism biodegrades the matter concerned, respiratory activity goes up, and, as a result, the oxygen density in a sample solution decreases. This amount of dissolved oxygen is measured with an oxygen electrode, the oxygen density before a sample solution is introduced, and change of the amount of dissolved oxygen are regarded as reduction of a current which

flows an oxygen electrode, and it is in a sample solution. C12LAS Concentration is measured. The equipment used for measurement Therefore, a bioreactor, a thermostat, and an oxygen electrode, The recorder equipped with the device which records a voltameter and a current value change, and the pump for liquid sending, since it is only piping -- a compact thing -- it can make -- measurement duration 10-30 a part -- extent -- (it is mainly dependent on pH of a sample solution) it is, since amendment of measured value is still more possible The technical problem of the previous statement in the conventional technique is solved, and the purpose of this invention is attained.

[0013]

[Example] etc. next, an anionic surfactant -- the example of acquisition, the example, and the example of a trial of the microorganism which has resolution -- being related -- this invention -- further -- a detail -- and it explains concretely. The example active sludge of acquisition of a microorganism, and the river water of every place to 0.01 Weight % C12LAS 0.10 The strain grown in the limiting medium only containing a weight % yeast extract was isolated and acclimated. It is the obtained strain. C12LAS The strain which whose resolution is almost the same and is excellent is the following. 6 It is a class and ****ed to Fermentation Research Institute.

(a) *Pseudomonas* SEPASHIA H-4 (FERM P-14534), (b) *Pseudomonas putida* K4-3 (FERM P-14535), (c) *Klebsiella* new MONIAE E-1 (FERM P-14536), (d) *Klebsiella* new MONIAE K4-1 (FERM P-14537) and (e) *Klebsiella* plan CHIKORA O-1 (FERM P-14538) And (f) *Serratia marcescens* K3-2 (FERM P-14539).

[0014] Example Fig. 1 As being shown C12LAS The gaging system was built. This gaging system 10 It sets and is 12. Sample solution 121 It is the held bottle with a magnetic type stirrer. 14 Bottle 12 It is the same, however the buffer solution. 141 It is the bottle to hold. 16 The buffer solution 141 And sample solution 121 Liquid-sending pump of ** (a peristaltic pump and peristaltic pump) it is -- 18 Thermostat 181 It is the

thermostat which it had and is 20. It is a microorganism fixed reactor. 22 Flow cell (flow cell) It is the oxygen electrode of a type. 24 Oxygen electrode 22 the recorder equipped with the device which makes a chart reduction change of the voltameter and current which measure continuously the current which can be set, and carries out the registration -- it is -- 26 -- piping 28 and 30 and -- 32 pass -- it is the bottle for waste fluid which receives the liquid discharged from a free end. microorganism fixed reactor 20 Glass capillary 201 Previous statement C12LAS a resolvability microorganism is supported to calcium-alginate gel -- making -- the above-mentioned capillary 201 Immobilized microorganism with which it was filled up inside 203 Buffer solution 141 And sample solution 121 In order for the suspended matter which exists by the case in a sample solution to reach microorganism immobilization support and to make it not spoil the function as an immobilized microorganism does not flow out on the occasion of liquid sending Capillary 201 Permeable packing arranged to both ends (not shown) It has and is this microorganism fixed reactor. 20 Rubber tube It pipes in 205a and 205b. 30 32 It connects.

[0015] the case where example of trial concentration is measured is shown below. even if it uses which microorganism among the microorganisms shown in the "example of acquisition of a microorganism" of 1 above -- the optimal conditions of a microorganism, and C12LAS although the measurement result of concentration etc. was the same -- klebsiella new MONIAE of the river water origin E-1 (FERM P-14536) adopting -- drawing 1 the gaging system shown -- using -- C12LAS optimal conditions of the above-mentioned microorganism pH 7.0 and 35 degrees C it is -- although -- the life of a microorganism thru/or the stability as a sensor -- considering -- pH 7.0 And temperature 30 degrees C It set up. that is, it becomes the various concentration which is known -- as -- C12LAS adding -- sample water solution (C12LAS concentration : 0, 1 and 2, and 4 mg/l) Water temperature [in / it prepares and / a thermostat] 30

degrees C It set up. (the buffer solution is not used) . By in addition, humid weight 2.5g A microorganism is fixed in calcium-alginate gel and it is a column. (a glass capillary, capacity :30ml) It put in and the bioreactor was constituted by putting permeable packing in both ends. Liquid-sending flow rate by the peristaltic pump 0.5ml/min. It sets up and the setups of a recorder are resisted. 5Kohm, electrical potential difference **10mV, chart speed 180mm/hr. It carried out, each above-mentioned sample water solution was sent, and the reduction degree of a current value was investigated. The response curve in this case is drawing. 2 It is as being shown and is C12LAS. It turns out that responsibility becomes high depending on concentration. In addition, a measurement duration is abbreviation. 10 It also turns out between parts that it is short.

[0016] Example of a trial Example of a trial of 2 above 1 It is in a sample water solution similarly. C12LAS The relation between concentration and the reduction degree of a current value was investigated. a result -- drawing 3 as being shown -- it is -- linearity C12LAS Concentration 0-7 mg/l it is -- limit of detection 0.1 mg/l it was . in addition, the case of the example of an exam -- optimum pH it is not -- a sake -- as a measurement duration 30 a part -- between -- it required.

[0017] example of a trial Example of a trial of 3 previous statement 1 the same conditions -- it is -- however -- as the buffer solution -- the tris hydrochloric-acid buffer solution (pH7.0) it uses and becomes the various concentration which is known at the **** buffer solution -- as -- C12LAS adding -- sample solution (C12LAS concentration : 0, 1, 2 and 3, and 4 mg/l) It prepared. in this case, inside of the sample solution which can be set C12LAS the relation between concentration and the deduction of a current -- drawing 4 as being shown -- it is -- C12LAS Concentration several -- mg/l until -- it was checked that almost linear responsibility is shown. In addition, the measurement duration in this case is abbreviation. 10 It was between parts.

[0018] Case where extracted river water from the river of every place, and it considers as a sample solution, and example of a trial 3 It is the buffer solution so that it can set. C12LAS In the case of the place and river water which compared the case where added and it considered as the sample solution of predetermined concentration, it became clear that an increment was accepted in the deduction of a current. Also in the case of what river water, this inclination was the same. This is considered that the effect of the interfering substance which exists in real samples, such as river water, has appeared as the background. Then, C12LAS. Trichosporon KUTANEUMU which is the yeast which has polyphagia although it does not have the receiving resolution (Trichosporoncutaneum) (A in drawing 4 part) IFO 10446 C12LAS It replaces with, fixes in calcium-alginate gel, and is an example of a trial. 1 It measures similarly and is drawing. 4 Straight line which can be set y The intercept was determined. Therefore, drawing 4 The graph shown can be used as a calibration curve.

[0019] example of a trial High-performance-chromatography method which is a measuring method and a conventional method according to this invention for 4 river water (correlation with a conventional method) C12LAS the result of having measured concentration and having investigated both correlation -- drawing it is shown in 5 -- having -- **** -- in this case -- regression $y = 0.08 + 0.76x$ it is -- a correlation coefficient -- 98% it is -- both -- it became clear that the method had high correlation.

[0020]

[Effect of the Invention] the anionic surfactant which serves as a standard of contamination, such as a river by synthetic detergent, especially by using the biosensor using a microorganism as a detecting element according to this invention -- especially -- carbon number 12 Since the concentration of straight chain nature alkyl benzene sodium sulfonate can be measured simple in a short time and an organic solvent is not used unlike a conventional method, environmental

pollution is not caused. The gaging system by this invention is simple, since it can constitute in a compact, it can measure also at the place of extraction of sample solution extraction, therefore monitoring of real time can be realized.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the schematic diagram of the anionic surfactant gaging system by this invention.

[Drawing 2] It is a carbon number as an anionic surfactant. 12 It is drawing, when straight chain nature alkyl benzene sodium sulfonate is adopted, the anionic surfactant water solution of various concentration is prepared and this is used as a sample solution. 1 It is the drawing in which reduction of a current value by which the automatic registration was carried out to the chart of the recorder in the gaging system shown is shown.

[Drawing 3] Sample solution pH It is the graph which shows the relation between the deduction of the current when not being an optimum value, and the anionic surfactant concentration in a sample solution.

[Drawing 4] drawing 3 it is the graph which is the same, however prepares the anionic surfactant buffer-solution solution of various concentration, and shows the relation between the deduction of the measured current, and the anionic surfactant concentration in a sample solution, and river water is applied as sample water in this graph -- as -- y Since the intercept is already amended, a calibration curve is a graph.

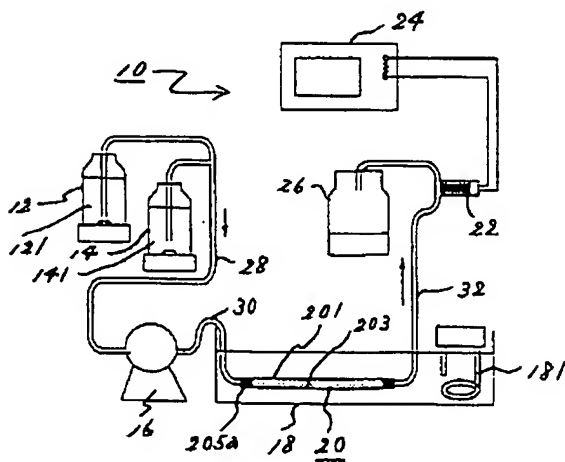
[Drawing 5] It is the graph which shows correlation with the measuring method by this invention, and the high-performance-chromatography method which is a conventional method and can be trusted in precision.

[Description of Notations]

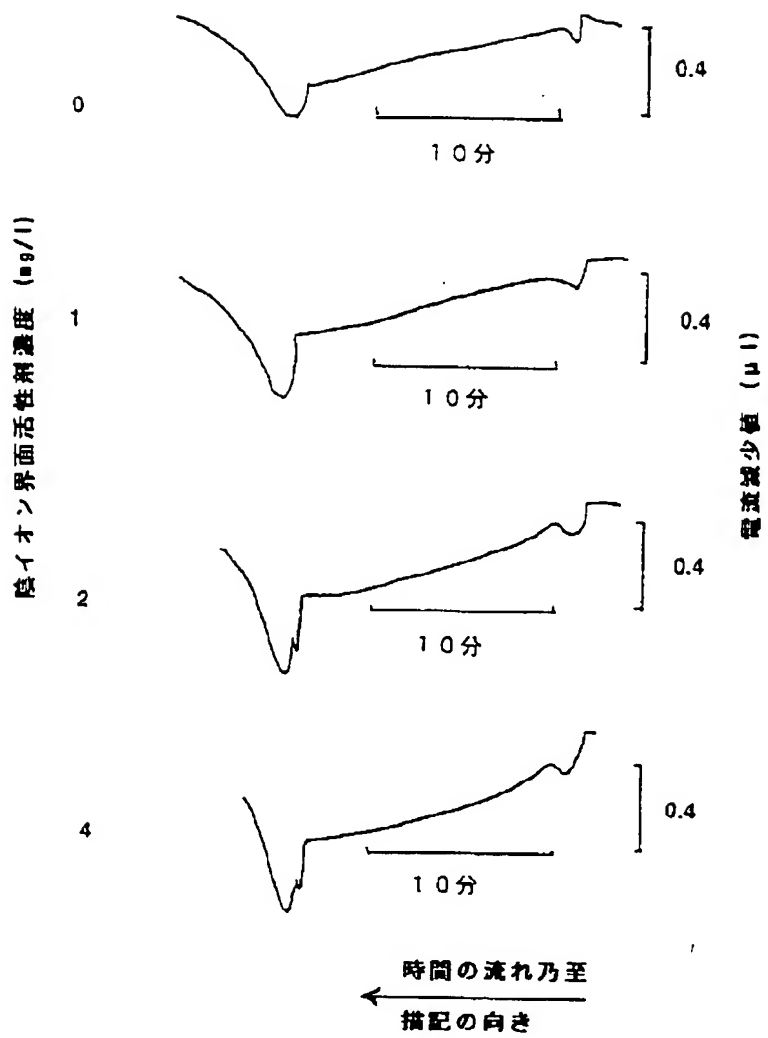
10 : Anionic Surfactant Gaging System,

12 : Sample Solution Bottle,
 121 : Sample Solution,
 14 : Buffer-Solution Bottle,
 141 : Buffer Solution,
 16 : Pump for Liquid Sending,
 18 : Thermostat,
 20 : Microorganism Immobilization (Biotechnology) Reactor,
 22 : Oxygen Electrode,
 24 : Recorder Equipped with Voltmeter and Device for Chart Registration,
 26 : Bottle for Waste Fluid

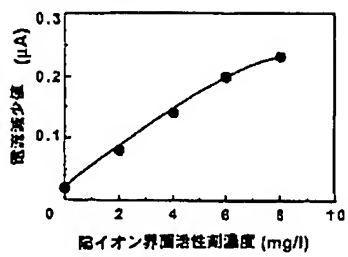
Drawing 1



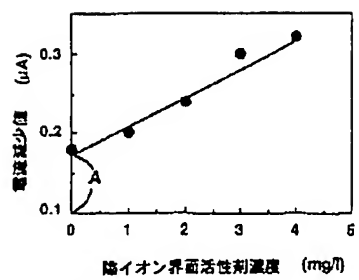
Drawing 2



Drawing 3



Drawing 4



Drawing 5

